

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 277-284	1 - 7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 269-276	1 - 7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 285-291	1 - 7
A	Yvon, T. et al. "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995), Vol. 378, p. 403-406	1 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

<ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 	<ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

 Date of the actual completion of the international search
 January 16, 1998 (16. 01. 98)

 Date of mailing of the international search report
 January 27, 1998 (27. 01. 98)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office
 Facsimile No.

 Authorized officer
 Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994), Vol. 6, p. 9-13	1 - 7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993), Vol. 16, No. 3, p. 572-579	1 - 7

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18	A1	(11) 国際公開番号 WO98/18920 (43) 国際公開日 1998年5月7日(07.05.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03946 (22) 国際出願日 1997年10月30日(30.10.97) (30) 優先権データ 特願平8/304059 ✓ 1996年10月30日(30.10.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 エスアールエル(SRL, INC.)(JP/JP) 〒190 東京都立川市曙町三丁目41番19号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 辻 省次(TSUJI, Shoji)(JP/JP) 〒950-21 新潟県新潟市小針1-10-45 Niigata, (JP) 三瓶一弘(SANPEI, Kazuhiro)(JP/JP) 〒950 新潟県新潟市大島98-1 アドバンテージA-203 Niigata, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: cDNA FRAGMENTS OF GENE CAUSATIVE OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 2 (54) 発明の名称 脊髄小脳変性症2型の原因遺伝子のcDNA断片 (57) Abstract The cDNA fragments of a gene causative of spinocerebellar ataxia type 2 having a determined base sequence. These cDNA fragments contain nucleic acid regions encoding the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 in the Sequence Listing, provided that the number of the repeating sequences of the 166th to 188th Gln varies within the range of from 15 to 100.		

(57) 要約

塩基配列が決定された、脊髄小脳変性症2型の原因遺伝子のcDNA断片が開示されている。本発明のcDNA断片は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰り返し数は15～100の間で変化する）をコードする核酸領域を含む。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CF	コンゴ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボワール	KR	韓国	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
CN	中国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CO	コロンビア	LC	セントルシア	RU	ロシア		
CU	キューバ	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
CY	キプロス			SG	シンガポール		
DE	ドイツ						

明細書

脊髄小脳変性症 2 型の原因遺伝子の cDNA 断片

技術分野

本発明は、脊髄小脳変性症 2 型（以下、「SCA 2」ということがある）の原因遺伝子の cDNA 断片、それがコードするタンパク質、該タンパク質に対する抗体及び前記 cDNA 断片のアンチセンス核酸に関する。

背景技術

SCA 2 は、小脳及び中枢神経系の他の領域に影響を与える、常染色体性優性神経変性症である。

最近、歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)) 等 6 種類の神経変性疾患において、原因遺伝子には CAG から成るトリプレットの反復数が正常な遺伝子よりも多く含まれていることが明らかになった。すなわち、これらの神経変性疾患患者の原因遺伝子では、CAG の反復数が 37 ~ 100 回であるのに対し、正常な遺伝子では 35 未満である。

SCA 2 についても、原因遺伝子では CAG の反復数が増大していることが示唆されている (Trottier, Y. et al. Nature, 378, 403-406 (1995))。しかしながら、SCA 2 の原因遺伝子は同定されておらず、その塩基配列も明らかではないので、SCA 2 を遺伝子検査により診断することはできない。

発明の開示

本発明の目的は、塩基配列が決定された、SCA 2 の原因遺伝子の cDNA 断片を提供することである。また、本発明の目的は、SCA 2 の治療や抗体調製のための免疫原として有用な、SCA 2 の原因遺伝子に基づいて産生されるタンパク質を提供することである。さらに、本発明の目的は、SCA 2 の治療や診断に有用な、該タンパク質に対する抗体を提供することである。さらに、本発明は、SCA 2 の治療に有用な、SCA 2 の原因遺伝子のアンチセンスを提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、SCA 2 患者においてのみ CAG トリプレットの繰返し数が増大している、2.5 kb の *Tsp* E1 断片を見出し、その部

分塩基配列を決定し、CAGトリプレットの繰返しを挟む2つの領域にそれぞれハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングしてこれら2種類のプローブの両方とハイブリダイズするcDNA断片をクローニングし、さらにこのcDNA断片をプローブとして用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし、このプローブとハイブリダイズするcDNA断片を複数クローニングした。これらのcDNA断片の塩基配列を決定したところ、これらは互いに重複していた。5'末端側及び3'末端側の領域の塩基配列を決定するために、さらにRACE (rapid amplification of cDNA ends) を行ない、さらに5'側の端部の塩基配列を決定するためにRT-PCRを行ない、SCA2の原因遺伝子のcDNAの全領域の塩基配列を決定することに成功した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰返し数は15～100の間で変化する）をコードする核酸領域を含む核酸断片を提供する。また、本発明は、上記本発明の核酸断片によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質を提供する。さらに本発明は、該タンパク質と抗原抗体反応を行う抗体を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸断片から転写されるmRNAとハイブリダイズしてその翻訳を阻害する、15bp以上のサイズを有するアンチセンス核酸を提供する。

本発明により、塩基配列が決定された、SCA2の原因遺伝子のcDNA断片が提供された。本発明の核酸断片によりコードされるタンパク質はSCA2の治療に用いることができるし、また、SCA2の治療及び診断に有用な抗体を調製するための免疫原として用いることができる。さらに、本発明により、SCA2の原因遺伝子の塩基配列が明らかにされたので、該遺伝子に対するアンチセンスを設計することが可能になった。さらに、本発明により、上記本発明の核酸断片を、ヒト体内で所望の遺伝子を発現させることができる発現ベクターに組込んだ、ヒト体内で前記核酸断片を発現させることができる組換えベクター並びに該組換えベクターをヒトに導入し、ヒト体内で本発明の核酸断片を発現させる方法が提

供された。このように、本発明はSCA2の治療及び診断に大いに貢献するものと考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施例において決定された、本発明のcDNA断片の塩基配列をそれがコードするアミノ酸配列とともに示す図である。

図2は、図1の続きを示す図である。

図3は、図2の続きを示す図である。

図4は、図3の続きを示す図である。

図5は、本発明の実施例において材料として用いられたDNAが由来するSCA2患者の家系図である。

図6は、本発明の実施例において得られたゲノミックDNA断片TspI及びTsp2並びにSCA2 cDNAのサイズ、位置及び制限酵素部位並びに得られた各cDNA断片のサイズ及び位置を示す図である。

図7は、(CAG)₅₅プローブを用いて測定された、正常遺伝子及びSCA2遺伝子中のCAG反復単位の数分布を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明の核酸断片は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする核酸領域を含む。ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰返し数は15～100の間で変化する。なお、この繰返し数は、健康人では15～25個であり、一方、SCA2患者では35～100個である。なお、周知のように、縮重により1つのアミノ酸をコードするコドンは複数存在するが、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするものであれば、いずれの塩基配列を有するものであっても本発明の範囲に含まれる。なお、下記実施例において実際に決定された塩基配列は配列番号1及び図1～4に示される。この塩基配列がどのようにして決定されたか、また、この塩基配列を有するcDNAがSCA2の原因遺伝子のcDNAであることは下記実施例に詳述されている。

本発明の核酸断片は、下記実施例に詳述する方法によりクローニングすることができる。また、本発明の核酸断片は、本発明によりその塩基配列が決定された

ので、ヒトcDNAライブラリーを鋳型として用いたPCRによる増幅や、さらにそのPCR産物をプローブとしたハイブリダイゼーションにより、クローニングすることができる。なお、単一のPCRで増幅することが困難な場合には、複数の領域に分け、増幅産物を常法により連結してクローニングすることもできる。

- 5 上記本発明の核酸断片を、常法により、市販の発現ベクターのマルチクローニング部位に組込み、得られた組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより、該核酸断片によりコードされるタンパク質を発現させることができる。任意の遺伝子を宿主細胞内で発現させるための宿主-ベクター系は、この分野において周知であり、多くの宿主-ベクター系が市販されている。このような市販の宿主-ベクター系を用いて当業者は容易に本発明の核酸断片を発現させてタンパク質を生産することができる。このような周知の方法は例えば、D. M. Glover, DN
10 A Cloning Volume III a practical approach, 1987, IRL Pressに記載されている。

- 例えば、本発明の核酸断片を、定法に従い、プライマーに制限酵素部位を導入したロングPCR (LA PCR) (向井博之 蛋白質核酸酵素 Vol41, No. 5, 585-594, 1
15 996) を用いて増幅させ、増幅産物を制限酵素処理し、これを市販のプラスミドベクターであるpGEX (ファルマシア社製) のマルチクローニング部位に挿入してライゲーションし、得られた組換えベクターで大腸菌DH5 α 株 (GIBCO BRL社製) を常法である塩化カルシウム法により形質転換し、薬剤耐性マーカー (ア
20 ンピシリン耐性) の形質転換株を選択し、該形質転換株からSCA2の原因遺伝子がコードするタンパク質を回収することができる。またこのベクターを用いると目的蛋白質は、GST (Glutathion S-Transferase) との融合蛋白質として発現するので、市販の抗GST抗体 (ファルマシア社製) を用いて容易に検出する事ができる。

- 25 健常人の遺伝子 (CAGリピートが15~25回) に基づいて産生されたタンパク質で活性を持つものは、正常な機能を有していると考えられるので、これをSCA2患者に投与することによりSCA2を治療し又はその症状を軽減させることができる。ただしSCA2の遺伝形式は、常染色体優性遺伝であるので、後

述するアンチセンスにより、患者由来のSCA2原因遺伝子を同時にブロックする必要がある。

上記本発明のタンパク質又は免疫原性を有するその一部を免疫原として用いて動物を免疫し、該動物から常法により該タンパク質又はその部分に対する抗体を回収することができる。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体も周知の方法により調製できる。

また CAG リピートによってコードされるポリグルタミン鎖を用いて、その長さの違いのみによって反応性の異なる抗体を作製することは論理的に困難であるが、本発明で明らかになった、蛋白質の全長を用いることにより、健常人と患者の蛋白質の違いを立体構造の違いとして認識する抗体をつくることができる。さらに本発明により、SCA2 遺伝子産物で、健常人と患者に共通な部分を用いて抗体を作製することができるので、本発明蛋白質に対する抗体を用いた、あらゆる検出系において対照が可能となる。これらの抗体を用いて、定法により、例えばプレート法のような簡便な検出法を作ることができる。

また、本発明の抗体を、周知の方法によりアガロースゲル（例えばファルマシア社のセファデックス（商品名）等）やポリスチレンビーズ等に常法により不動化し、カラムに詰めてアフィニティーカラムを作製することができる。このアフィニティーカラムに患者の体液（血液、血清、髄液等）を通すことにより、患者のSCA2原因遺伝子由来タンパク質を取得することができ、これを溶離してその分子量を測定することにより、SCA2の診断を行うことができる。なぜならSCA2患者の当該タンパク質は健常人のものよりも、CAGリピートが多い分だけ分子量が大きいからである。

また遺伝子治療としては、異常SCA2産物の産生停止と正常SCA2産物の導入の2通りが考えられ、前者の方法としては、アンチセンスを使った、mRNAの翻訳のブロック、後者の方法としては、前述のような、インビトロで得られたSCA2遺伝子産物の投与や当該核酸断片の細胞内への導入がある。CAGリピートの伸長によるSCA2患者においては、異常タンパク質が優性に作用すると考えられていることから、両者を同時に行うことで効果が得られると予想されるが、該

核酸断片の導入の場合はアンチセンスを S C A 2 産物の活性に関与しない部分に設定し、導入される正常 S C A 2 遺伝子からはその部分を取り除き、互いに効果を相殺させないようにする。またそのようにアンチセンスと正常 S C A 2 遺伝子を設定することにより、上記アンチセンスと S C A 2 遺伝子を同一ベクター内に組込んで細胞内へ導入することも可能である。

5 本発明のアンチセンス核酸は、本発明の核酸断片から転写される mRNA とハイブリダイズしてその翻訳を阻害するものであり、少なくとも 15 b p のサイズを有する。アンチセンスのサイズは 15 b p 以上、核酸断片のコード領域の全長以下のサイズを有することが好ましく、より好ましくは 50 b p 以上、コード領域の全長以下である。アンチセンス核酸は、本発明の核酸断片から転写される mRNA の全部又は一部と完全に相補的な塩基配列を有していることが好ましいが、
10 生体内でハイブリダイズできるだけの相同性を有しているものも本発明の範囲内に含まれる。本発明のアンチセンスを S C A 2 患者に投与することにより、患者の S C A 2 原因遺伝子をブロックすることができ、そうした上で健常人由来の上記タンパク質を投与することにより S C A 2 の治療又は症状の軽減を達成することができる。アンチセンス核酸の投与量は、患者の状態により適宜選択されるが、
15 通常体重 1 k g、1 日当り本発明のアンチセンス核酸を 0.001 mmol ~ 1000 mmol 程度投与する。

20 遺伝子を生体内に導入する主な手段として、レトロウイルスやアデノウイルスをベクターとして用いる方法（瀬戸口靖弘、実験医学 Vol. 12 No. 15（増刊）1994, pp. 114-121；鐘ヶ江裕美ら、実験医学 Vol. 12 No. 15（増刊）1994, pp. 34-40）、リポソームによる方法、あるいはそれらを融合したもの（膜融合リポソーム等）が知られている。そのうちのアデノウイルスは、標的細胞の分裂増殖なしで導入遺伝子を発現させるため、当該核酸を神経系へ導入する手段としてもっとも適当である。具体的には野生株アデノウイルス 5 型 DNA の E1a の一部と E3 を取り除
25 き、二本鎖 DNA とした当該核酸をプロモーター等の発現ユニットと共に組み込み、E1a、E1b 遺伝子を発現するヒト胎児腎由来の 293 細胞で増殖させ、ウイルス液を調整して接種する。細胞核内に取り込まれたウイルスゲノムは複製すること

なく染色体外にあり、神経細胞では細胞分裂によってウイルスゲノムが失われないので、1～3ヶ月間は、正常 SCA2 遺伝子の発現を持続させることができる。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

5 実施例 1

(1) (CAG)₅₅ プローブの調製

CAG 反覆単位を 50 個含む歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)) 遺伝子 (Koide, R. et al., Nature Genet., 6, 9-13 (1994)) を DRPLA 患者のゲノミック DNA から増幅し、プラスミドベクター pT7Blue T (p-2093) にサブクローニングした。p-2093 は、(CAG)₅₅ 及びその両端のフランキング配列を含む。すなわち、5'-CAC CAC CAG CAA CAG CAA (CAG)₅₅ CAT CAC GGA AAC TCT GGG CC-3' で表される配列を含む。一対のオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち、5'-CAC CAC CAG CAA CAG CAA CA-3' 及び 5'-ビオチン-GGC CCA GAG TTT CCG TGA TG-3' を用いて PCR を行なった。PCR は、10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2M N,N,N-トリメチルグリシン、0.1 mM TTP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 9.25 MBq の [α-³²P]dATP (222 TBq/mmol), 0.5 μM ずつの各プライマー、0.3 ng のプラスミド DNA (p-2093) 及び 2.0 U の Taq DNA ポリメラーゼ (日本国京都府の宝酒造社製) を含む全量 16 μl の溶液を用いて行った。最初に 94℃ で 2 分間変性を行った後、94℃、1 分の変性、54℃、1 分のアニーリング、72℃、3 分の伸長を 30 サイクル行い、最後に 72℃ で 10 分間伸長を行った。

20 μl のストレプトアビジンを被覆した磁化ビーズ (Dynabeads M-280, Streptavidin; ノルウェー、DynaL AS 社製) を用いて一本鎖 (CAG)₅₅ プローブを調製した。すなわち、PCR 産物をストレプトアビジン被覆磁化ビーズに吸着させた後、5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM EDTA 及び 1 M NaCl を含む 40 μl の溶液でビーズを洗浄した。次いで 50 μl の 0.1 M NaOH 溶液中で 10 分間インキュベートすることにより、放射標識された非ビオチン化鎖をビオチン化鎖から分離した。得られた上清をプローブ液としてそのまま下記ハイ

ブリダイゼーションに用いた。

なお、上記のようにして調製した一本鎖(CAG)₅₅プローブを用いて、CAG反復単位数が9、22、43、51であるアンドロゲンレセプター遺伝子についてサザン分析を行ったところ、(CAG)₅₅プローブはCAG反復単位が43及び51
5 個の遺伝子とは強くハイブリダイズしたが、22個の遺伝子とはほとんどハイブリダイズせず、9個の遺伝子とは全くハイブリダイズしなかった(K. Sanpei et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.212, No.2, 1995, pp. 341-346)。すなわち、このプローブを用いれば、ハイブリダイゼーション条件を適正に設定することにより、CAG反復単位を多数(例えば35個以上)
10 含むDNAとのみ特異的にハイブリダイズさせることが可能である。

(2) SCA2 遺伝子の塩基配列決定

図5には、SCA2患者の家系図を示す。この家系図において、男性が四角、女性が丸で示されており、患者は黒く塗りつぶされており、健常人は白抜きで示されている。

15 これらのSCA2患者及び健常人から常法により採取した高分子量ゲノミックDNA(各15 μ g)を100UのTspEI(日本国大阪府の東洋紡績社製)で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜に転写した。次いで、該膜を上記(CAG)₅₅プローブとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、2.75 \times SSPE(1 \times SSPE=150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM
20 EDTA), 50%ホルムアミド、5 \times デンハルツ液、100 ng/ml 剪断サケ精子DNA及び(CAG)₅₅プローブ(6 \times 10⁶ cpm/ml)を含む溶液中で62 $^{\circ}$ Cで18時間行った。ハイブリダイゼーション後、0.5% SDSを含む1 \times SSC(150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム)で膜を65 $^{\circ}$ Cで0.5時間洗浄した。次いで、MS増感スクリーンを用い、Kodak Bio Max MS フィルムに16時間-70 $^{\circ}$ Cでオート
25 ラジオグラフィーにかけた。

その結果、全てのSCA2患者についてのみ、プローブとハイブリダイズした2.5 kbp のTspEI断片が検出された。

そこで、一人のSCA2患者(図5中の7)からゲノミックDNAを常法によ

り抽出し、その270 μ gをTspEIで消化し、アガロースゲル電気泳動にかけた。上記した2.5 kbのTspEI断片を包含するゲノミックDNA断片を、EcoRIで開裂した λ ZAPII (Stratagene 社製) ベクターにクローニングした。得られたゲノミックライブラリーを上記(CAG)₅₅ プローブを用い、上述したハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせることによりスクリーニングした。増大したCAG反復を含むゲノミッククローンTsp1が単離された。

プローブを除去した後、ランダムプライム法により標識したTsp1をプローブとして用いて上記ゲノミックライブラリーを再度スクリーニングした。ハイブリダイゼーションは5 x SSC, 1 x デンハルツ液、10%硫酸デキストラン、20 mMリン酸ナトリウム、400 μ g/mlのヒト胎盤DNA及びTsp1プローブを含む溶液中で42°Cで18時間行った。ハイブリダイゼーション後、膜を最終的に0.1 x SSC-0.1% SDS中で52°Cで0.5時間洗浄した。MS増感スクリーンを用い、膜をKodak Bio Max MSフィルムに-70°Cで24時間オートラジオグラフィにかけた。その結果、正常な対立遺伝子由来のゲノミッククローンであるTsp2が単離された。

また、Tsp2のSmaI-ApaI断片(630 bp)の塩基配列を決定し、CAG反復領域を挟むようにオリゴヌクレオチドF-1 (5'-CCC TCA CCA TGT CGC TGA AGC-3')及びR-1 (5'-CGA CGC TAG AAG GCC GCT G-3')を設定した(図1参照)。ヒト前脳皮質cDNAライブラリー(Stratagene 社製)をオリゴヌクレオチドF-1及びR-1をプローブとして用いてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、6 x SSC, 10 x デンハルツ液、0.5% SDS, 0.05% ピロリン酸ナトリウム、100 ng/ml 剪断サケ精子DNA及び末端標識オリゴヌクレオチドプローブを含む溶液中で55°Cで18時間行った。ハイブリダイゼーション後、膜を最終的に0.5% SDS 及び0.05% ピロリン酸ナトリウムを含む6 x SSC中で55°Cで0.5時間洗浄した。両方のプローブとハイブリダイズする、4.0 kbのcDNAクローンFc1が得られた。Fc1、Tsp1及びTsp2の塩基配列を決定し、比較したところ、CAG反復領域近傍の塩基配列は、CAGの反復回数を除き一致していた。なお、Tsp1及びTsp2の制限酵素地図並びにFc1及び後述の他の断片のサイズ及

び位置を図6に示す。さらに、Fc1 又は以降のスクリーニングにより単離された断片をプローブとして用いて種々のヒトcDNAライブラリー（ヒト前脳皮質、ヒト胎児脳、ヒト脳及びヒト脳幹）をスクリーニングすることにより、cDNAクローンFc2、Fb14、B4、C6及びC19を単離した（図6参照）。Fc1の5'末端を同定するために、5'-RACE-Ready cDNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA)を用いて5'-RACEを行った（Frohman, M. A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002 (1988)）。プライマーR-1を第1のPCRに用い、プライマーR-2（5'-CTT GCG GAC ATT GGC AGC C-3'、図1参照）を第2のPCRに用いた。なお、forward側のプライマーとしてはいずれの場合もF-1（図1参照）を用いた。350 bpの5'-RACE産物（5R1）をpT7Blue Tベクターにサブクローニングした（pT7Blue T-vector（5R1））。5R1の同一性は、Fc1、Tsp1及びTsp2の塩基配列とのオーバーラップにより確認した。cDNAの3'末端を同定するために、ヒト脳から抽出されたpoly(A)⁺mRNAの1 µgを鋳型として用い、プライマーF-13（5'-TTC TCT CAG CCA AAG CCT TCT ACT ACC-3'、図3参照）をプライマーとして用いて3'-RACEを行なった。得られた1300 bpの3'-RACE産物（3R1）をpT7Blue Tベクターにサブクローニングした（pT7Blue T-vector（3R1））。

cDNAの5'領域をさらに調べるために、逆転写PCR（RT-PCR）を行なった。すなわち、ヒト脳からのオートプシーから抽出された全RNAを先ず、RNaseフリーのDNase（Promega社製）で消化した（Onodera, O. et al., Am. J. Hum. Genet. 57, 1050-1060(1995)）。逆転写反応は、2 µgの全RNAと、20 pmolのランダムヘキサマーを用い、42°Cで行なった（Onodera, O. et al., 前掲）。PCRのプライマーとしては、F1006（5'-TAT CCG CAG CTC CGC TCC C-3'、図1参照）及びR1002（5'-AGC CGG GCC GAA ACG CGC CG-3'、図1参照）を用いた。5 pmolずつの各プライマー、10 mM Tris HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.7M N,N,N-トリメチルグリシン、200 µMずつのdATP, dCTP及びTTP、100 µMのdGTP、100 µMの7-デアザdGTP及び2.5 UのTaqポリメラーゼ（宝酒造社製）を含む総量20 µlの溶液中でPCRを行なった。96

℃で2分間初期変性を行なった後、96℃1分間の変性工程、65℃1分間のアニーリング工程、72℃1分間の伸長工程から成るサイクルを30回繰り返す、最後に72℃で5分間伸長することによりPCRを行なった。その結果、5R1の上流に246 bp 延びる、クローン5R1を得た(図6参照)。

5 なお、図6中、Tsp1及びTsp2断片中の白抜きの部分はSCA2 cDNA中に存在する領域を示す。また、SCA2 cDNA中の白抜きの部分はコード領域を示す。CAG反復領域の位置は黒塗りのボックスで示されている。TspE1 (T)、NotI (N)、Sac II (S)、Sau3AI (Sa)、Sma I (Sm)、Eco52I (E52)、Apa I (Ap)、AccI (Ac)、BamHI (B)、XhoI (X)、EcoRI (E) 及びPst I (P) の制限酵素部位が示されている。各cDNAクローンのサイズ及び位置がコンセンサスSCA2 cDNAの下に示されている。

10 本実施例においては、二本鎖プラスミドDNAを鋳型として用いたジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977); Chen E.Y. et al, DNA 4, 165-170 (1985))によりDNAの二本鎖の塩基配列を決定した。CAG反復領域及びその隣接領域の塩基配列を決定するために、ビオチン化したF-1 及びRS-1(5'-CCT CGG TGT CGC GGC GAC TTC C-3')を用いたPCRにより、CAG反復領域を含むゲノミック断片を増幅した。0.25 µMずつの各プライマー、10 mM Tris HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 1.7M N,N,N-トリメチルグリシン、200 µM ずつ
15 のdNTP、200 ngのゲノミックDNA、及び1.25 UのTaq ポリメラーゼ(宝酒造社製)を含む総量25 µlの溶液中でPCRを行なった。95℃で2分間初期変性を行なった後、95℃1分間の変性工程、62℃1分間のアニーリング工程、72℃1分間の伸長工程から成るサイクルを32回繰り返す、最後に72℃で5分間伸長することによりPCRを行なった。ストレプトアビジン被覆磁石ビーズ
20 を用いてビオチン化された鎖を回収し、直接塩基配列分析を行なった。

25 上記各cDNAクローンの塩基配列に基づき、ポリAテールを除いて4351 bpのコンセンサスSCA2 cDNA配列を決定した(配列番号1及び図1~4、図6参照)。なお、配列番号1の4352 nt~4367 ntはポリAテールを

示すものであり、Aの数は必ずしも配列番号1に記載のものに限らない。なお、独立したcDNAクローンであるC19、B4及び3R1において、同一の位置にポリAテールが存在することが確認された。

実施例2 検体中のCAG反復単位数の測定

5 プライマーF-1及びR-1を用いて得られたPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることにより、CAG反復単位数を測定した。PCRは、10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 1.7 M N,N,N-トリメチルグリシン、111KBqの[α -³²P]dCTP (111 Tbq/mmol), 30 μ M dCTP, 各 200 μ MのdATP, dGTP及びTTP, 各 0.25 μ Mの上記2種類のプライマー、200 ngの
10 ゲノミックDNA並びに1.25 UのTaq DNAポリメラーゼを含む全量10 μ lの溶液で行った。まず、95°C、2分間変性を行った後、95°C、1分間の変性、60°C、1分間のアニーリング及び72°C、1分間の伸長からなるサイクルを32回繰り返し、最後に72°C、5分間の伸長を行った。SCA2遺伝子のクローン化されたゲノミック領域を用いて得られた、種々のサイズのCAG反復単位を含む配列ラダー(sequence ladder)をサイズマーカーとして用いた。CAG反復領域中にCAAを含む正常な対立遺伝子の場合には、これらのCAA単位はCAG反復サイズに含めた。CAG領域が増大しているSCA2対立遺伝子の場合、CAG領域直後の上記挿入配列はCAG領域のサイズには含めなかった。

上記の方法により、健常人(286染色体)及び10家系のSCA2患者(3
20 4種のSCA2染色体)におけるCAG反復単位数を測定した。結果を図7に示す。図7中、白抜きの棒グラフが正常遺伝子についての結果を示し、黒塗りの棒グラフがSCA2遺伝子についての結果を示す。

図7から明らかなように、正常遺伝子ではCAG反復単位数が全て24個以下であるのに対し、SCA2遺伝子では全て35個以上であった。よって、上記
25 により特定されたcDNAは、SCA2の原因遺伝子のcDNAであることが確認された。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 4 3 6 7

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

	TATCCGCACC TCCGCTCCCA CCCGGCGCCT CGGCGCGCCC GCCCTCCG ATG CGC TCA	57
	Met Arg Ser	
10	1	
	GCG GCC GCA GCT CCT CGG AGT CCC GCG GTG GCC ACC GAG TCT CGC CGC	105
	Ala Ala Ala Ala Pro Arg Ser Pro Ala Val Ala Thr Glu Ser Arg Arg	
	5 10 15	
	TTC GCC GCA GCC AGG TGG CCC GGG TGG CGC TCG CTC CAG CGG CCG GCG	153
15	Phe Ala Ala Ala Arg Trp Pro Gly Trp Arg Ser Leu Gln Arg Pro Ala	
	20 25 30 35	
	CGG CGG AGC GGG CGG GGC GGC GGT GGC GCG GCC CCG GGA CCG TAT CCC	201
	Arg Arg Ser Gly Arg Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Gly Pro Tyr Pro	
	40 45 50	
20	TCC GCC GCC CCT CCC CCG CCC GGC CCC GGC CCC CCT CCC TCC CGG CAG	249
	Ser Ala Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Pro Pro Pro Ser Arg Gln	
	55 60 65	
	AGC TCG CCT CCC TCC GCC TCA GAC TGT TTT GGT AGC AAC GGC AAC GGC	297
	Ser Ser Pro Pro Ser Ala Ser Asp Cys Phe Gly Ser Asn Gly Asn Gly	
25	70 75 80	
	GGC GGC GCG TTT CGG CCC GGC TCC CGG CGG CTC CTT GGT CTC GGC GGC	345
	Gly Gly Ala Phe Arg Pro Gly Ser Arg Arg Leu Leu Gly Leu Gly Gly	
	85 90 95	

	CCT CCC CGC CCC TTC GTC GTC GTC CTT CTC CCC CTC GCC AGC CCG GGC	393
	Pro Pro Arg Pro Phe Val Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Ser Pro Gly	
	100 105 110 115	
	GCC CCT CCG GCC GCG CCA ACC CGC GCC TCC CCG CTC GGC GCC CGT GCG	441
5	Ala Pro Pro Ala Ala Pro Thr Arg Ala Ser Pro Leu Gly Ala Arg Ala	
	120 125 130	
	TCC CCG CCG CGT TCC GGC GTC TCC TTG GCG CGC CCG GCT CCC GGC TGT	489
	Ser Pro Pro Arg Ser Gly Val Ser Leu Ala Arg Pro Ala Pro Gly Cys	
	135 140 145	
10	CCC CGC CCG GCG TGC GAG CCG GTG TAT GGG CCC CTC ACC ATG TCG CTG	537
	Pro Arg Pro Ala Cys Glu Pro Val Tyr Gly Pro Leu Thr Met Ser Leu	
	150 155 160	
	AAG CCC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAA	585
	Lys Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	
15	165 170 175	
	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CCG CCG CCC GCG GCT GCC AAT	633
	Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn	
	180 185 190 195	
	GTC CGC AAG CCC GGC GGC AGC GGC CTT CTA GCG TCG CCC GCC GCC GCG	681
20	Val Arg Lys Pro Gly Gly Ser Gly Leu Leu Ala Ser Pro Ala Ala Ala	
	200 205 210	
	CCT TCG CCG TCC TCG TCC TCG GTC TCC TCG TCC TCG GCC ACG GCT CCC	729
	Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ala Pro	
	215 220 225	
25	TCC TCG GTG GTC GCG GCG ACC TCC GGC GGC GGG AGG CCC GGC CTG GGC	777
	Ser Ser Val Val Ala Ala Thr Ser Gly Gly Gly Arg Pro Gly Leu Gly	
	230 235 240	
	AGA GGT CGA AAC AGT AAC AAA GGA CTG CCT CAG TCT ACG ATT TCT TTT	825

	390	395	400	
	TAT AAT GAA GAA AAT TAT GGT GTA GTG TCT ACG TAT GAT AGC AGT TTA	1305		
	Tyr Asn Glu Glu Asn Tyr Gly Val Val Ser Thr Tyr Asp Ser Ser Leu			
	405	410	415	
5	TCT TCG TAT ACA GTG CCC TTA GAA AGA GAT AAC TCA GAA GAA TTT TTA	1353		
	Ser Ser Tyr Thr Val Pro Leu Glu Arg Asp Asn Ser Glu Glu Phe Leu			
	420	425	430	435
	AAA CGG GAA GCA AGG GCA AAC CAG TTA GCA GAA GAA ATT GAG TCA AGT	1401		
	Lys Arg Glu Ala Arg Ala Asn Gln Leu Ala Glu Glu Ile Glu Ser Ser			
10	440	445	450	
	GCC CAG TAC AAA GCT CGA GTG GCC CTG GAA AAC GAT GAT AGG AGT GAG	1449		
	Ala Gln Tyr Lys Ala Arg Val Ala Leu Glu Asn Asp Asp Arg Ser Glu			
	455	460	465	
	GAA GAA AAA TAC ACA GCA GTT CAG AGA AAT TCC AGT GAA CGT GAG GGG	1497		
15	Glu Glu Lys Tyr Thr Ala Val Gln Arg Asn Ser Ser Glu Arg Glu Gly			
	470	475	480	
	CAC AGC ATA AAC ACT AGG GAA AAT AAA TAT ATT CCT CCT GGA CAA AGA	1545		
	His Ser Ile Asn Thr Arg Glu Asn Lys Tyr Ile Pro Pro Gly Gln Arg			
	485	490	495	
20	AAT AGA GAA GTC ATA TCC TGG GGA AGT GGG AGA CAG AAT TCA CCG CGT	1593		
	Asn Arg Glu Val Ile Ser Trp Gly Ser Gly Arg Gln Asn Ser Pro Arg			
	500	505	510	515
	ATG GGC CAG CCT GGA TCG GGC TCC ATG CCA TCA AGA TCC ACT TCT CAC	1641		
	Met Gly Gln Pro Gly Ser Gly Ser Met Pro Ser Arg Ser Thr Ser His			
25	520	525	530	
	ACT TCA GAT TTC AAC CCG AAT TCT GGT TCA GAC CAA AGA GTA GTT AAT	1689		
	Thr Ser Asp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Ser Asp Gln Arg Val Val Asn			
	535	540	545	

	GGA GGT GTT CCC TGG CCA TCG CCT TGC CCA TCT CCT TCC TCT CGC CCA	1737
	Gly Gly Val Pro Trp Pro Ser Pro Cys Pro Ser Pro Ser Ser Arg Pro	
	550 555 560	
	CCT TCT CGC TAC CAG TCA GGT CCC AAC TCT CTT CCA CCT CGG GCA GCC	1785
5	Pro Ser Arg Tyr Gln Ser Gly Pro Asn Ser Leu Pro Pro Arg Ala Ala	
	565 570 575	
	ACC CCT ACA CGG CCG CCC TCC AGG CCC CCC TCG CGG CCA TCC AGA CCC	1833
	Thr Pro Thr Arg Pro Pro Ser Arg Pro Pro Ser Arg Pro Ser Arg Pro	
	580 585 590 595	
10	CCG TCT CAC CCC TCT GCT CAT GGT TCT CCA GCT CCT GTC TCT ACT ATG	1881
	Pro Ser His Pro Ser Ala His Gly Ser Pro Ala Pro Val Ser Thr Met	
	600 605 610	
	CCT AAA CGC ATG TCT TCA GAA GGG CCT CCA AGG ATG TCC CCA AAG GCC	1929
	Pro Lys Arg Met Ser Ser Glu Gly Pro Pro Arg Met Ser Pro Lys Ala	
15	615 620 625	
	CAG CGA CAT CCT CGA AAT CAC AGA GTT TCT GCT GGG AGG GGT TCC ATA	1977
	Gln Arg His Pro Arg Asn His Arg Val Ser Ala Gly Arg Gly Ser Ile	
	630 635 640	
	TCC AGT GGC CTA GAA TTT GTA TCC CAC AAC CCA CCC AGT GAA GCA GCT	2025
20	Ser Ser Gly Leu Glu Phe Val Ser His Asn Pro Pro Ser Glu Ala Ala	
	645 650 655	
	ACT CCT CCA GTA GCA AGG ACC AGT CCC TCG GGG GGA ACG TGG TCA TCA	2073
	Thr Pro Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Ser Gly Gly Thr Trp Ser Ser	
	660 665 670 675	
25	GTG GTC AGT GGG GTT CCA AGA TTA TCC CCT AAA ACT CAT AGA CCC AGG	2121
	Val Val Ser Gly Val Pro Arg Leu Ser Pro Lys Thr His Arg Pro Arg	
	680 685 690	
	TCT CCC AGA CAG AAC AGT ATT GGA AAT ACC CCC AGT GGG CCA GTT CTT	2169

	840	845	850	
	TGT ACC AGT GGC AGC AGC AAG CCG AAT AGC CCC AGC ATT TCC CCT TCA	2649		
	Cys Thr Ser Gly Ser Ser Lys Pro Asn Ser Pro Ser Ile Ser Pro Ser			
	855	860	865	
5	ATA CTT AGT AAC ACG GAG CAC AAG AGG GGA CCT GAG GTC ACT TCC CAA	2697		
	Ile Leu Ser Asn Thr Glu His Lys Arg Gly Pro Glu Val Thr Ser Gln			
	870	875	880	
	GGG GTT CAG ACT TCC AGC CCA GCA TGT AAA CAA GAG AAA GAC GAT AAG	2745		
	Gly Val Gln Thr Ser Ser Pro Ala Cys Lys Gln Glu Lys Asp Asp Lys			
10	885	890	895	
	GAA GAG AAG AAA GAC GCA GCT GAG CAA GTT AGG AAA TCA ACA TTG AAT	2793		
	Glu Glu Lys Lys Asp Ala Ala Glu Gln Val Arg Lys Ser Thr Leu Asn			
	900	905	910	915
	CCC AAT GCA AAG GAG TTC AAC CCA CGT TCC TTC TCT CAG CCA AAG CCT	2841		
15	Pro Asn Ala Lys Glu Phe Asn Pro Arg Ser Phe Ser Gln Pro Lys Pro			
	920	925	930	
	TCT ACT ACC CCA ACT TCA CCT CGG CCT CAA GCA CAA CCT AGC CCA TCT	2889		
	Ser Thr Thr Pro Thr Ser Pro Arg Pro Gln Ala Gln Pro Ser Pro Ser			
	935	940	945	
20	ATG GTG GGT CAT CAA CAG CCA ACT CCA GTT TAT ACT CAG CCT GTT TGT	2937		
	Met Val Gly His Gln Gln Pro Thr Pro Val Tyr Thr Gln Pro Val Cys			
	950	955	960	
	TTT GCA CCA AAT ATG ATG TAT CCA GTC CCA GTG AGC CCA GGC GTG CAA	2985		
	Phe Ala Pro Asn Met Met Tyr Pro Val Pro Val Ser Pro Gly Val Gln			
25	965	970	975	
	CCT TTA TAC CCA ATA CCT ATG ACG CCC ATG CCA GTG AAT CAA GCC AAG	3033		
	Pro Leu Tyr Pro Ile Pro Met Thr Pro Met Pro Val Asn Gln Ala Lys			
	980	985	990	995

	ACA TAT AGA GCA GTA CCA AAT ATG CCC CAA CAG CGG CAA GAC CAG CAT	3081
	Thr Tyr Arg Ala Val Pro Asn Met Pro Gln Gln Arg Gln Asp Gln His	
	1000 1005 1010	
	CAT CAG AGT GCC ATG ATG CAC CCA GCG TCA GCA GCG GGC CCA CCG ATT	3129
5	His Gln Ser Ala Met Met His Pro Ala Ser Ala Ala Gly Pro Pro Ile	
	1015 1020 1025	
	GCA GCC ACC CCA CCA GCT TAC TCC ACG CAA TAT GTT GCC TAC AGT CCT	3177
	Ala Ala Thr Pro Pro Ala Tyr Ser Thr Gln Tyr Val Ala Tyr Ser Pro	
	1030 1035 1040	
10	CAG CAG TTC CCA AAT CAG CCC CTT GTT CAG CAT GTG CCA CAT TAT CAG	3225
	Gln Gln Phe Pro Asn Gln Pro Leu Val Gln His Val Pro His Tyr Gln	
	1045 1050 1055	
	TCT CAG CAT CCT CAT GTC TAT AGT CCT GTA ATA CAG GGT AAT GCT AGA	3273
	Ser Gln His Pro His Val Tyr Ser Pro Val Ile Gln Gly Asn Ala Arg	
15	1060 1065 1070 1075	
	ATG ATG GCA CCA CCA ACA CAC GCC CAG CCT GGT TTA GTA TCT TCT TCA	3321
	Met Met Ala Pro Pro Thr His Ala Gln Pro Gly Leu Val Ser Ser Ser	
	1080 1085 1090	
	GCA ACT CAG TAC GGG GCT CAT GAG CAG ACG CAT GCG ATG TAT GCA TGT	3369
20	Ala Thr Gln Tyr Gly Ala His Glu Gln Thr His Ala Met Tyr Ala Cys	
	1095 1100 1105	
	CCC AAA TTA CCA TAC AAC AAG GAG ACA AGC CCT TGT TTC TAC TTT GCC	3417
	Pro Lys Leu Pro Tyr Asn Lys Glu Thr Ser Pro Ser Phe Tyr Phe Ala	
	1110 1115 1120	
25	ATT TCC ACG GGC TCC CTT GCT CAG CAG TAT GCG CAC CCT AAC GCT ACC	3465
	Ile Ser Thr Gly Ser Leu Ala Gln Gln Tyr Ala His Pro Asn Ala Thr	
	1125 1130 1135	
	CTG CAC CCA CAT ACT CCA CAC CCT CAG CCT TCA GCT ACC CCC ACT GGA	3513

Leu His Pro His Thr Pro His Pro Gln Pro Ser Ala Thr Pro Thr Gly
 1140 1145 1150 1155
 CAG CAG CAA AGC CAA CAT GGT GGA AGT CAT CCT GCA CCC AGT CCT GTT 3561
 Gln Gln Gln Ser Gln His Gly Gly Ser His Pro Ala Pro Ser Pro Val
 5 1160 1165 1170
 CAG CAC CAT CAG CAC CAG GCC GCC CAG GCT CTC CAT CTG GCC AGT CCA 3609
 Gln His His Gln His Gln Ala Ala Gln Ala Leu His Leu Ala Ser Pro
 1175 1180 1185
 CAG CAG CAG TCA GCC ATT TAC CAC GCG GGG CTT GCG CCA ACT CCA CCC 3657
 10 Gln Gln Gln Ser Ala Ile Tyr His Ala Gly Leu Ala Pro Thr Pro Pro
 1190 1195 1200
 TCC ATG ACA CCT GCC TCC AAC ACG CAG TCG CCA CAG AAT AGT TTC CCA 3705
 Ser Met Thr Pro Ala Ser Asn Thr Gln Ser Pro Gln Asn Ser Phe Pro
 1205 1210 1215
 15 GCA GCA CAA CAG ACT GTC TTT ACG ATC CAT CCT TCT CAC GTT CAG CCG 3753
 Ala Ala Gln Gln Thr Val Phe Thr Ile His Pro Ser His Val Gln Pro
 1220 1225 1230 1235
 GCG TAT ACC AAC CCA CCC CAC ATG GCC CAC GTA CCT CAG GCT CAT GTA 3801
 Ala Tyr Thr Asn Pro Pro His Met Ala His Val Pro Gln Ala His Val
 20 1240 1245 1250
 CAG TCA GGA ATG GTT CCT TCT CAT CCA ACT GCC CAT GCG CCA ATG ATG 3849
 Gln Ser Gly Met Val Pro Ser His Pro Thr Ala His Ala Pro Met Met
 1255 1260 1265
 CTA ATG ACG ACA CAG CCA CCC GGC GGT CCC CAG GCC GCC CTC GCT CAA 3897
 25 Leu Met Thr Thr Gln Pro Pro Gly Gly Pro Gln Ala Ala Leu Ala Gln
 1270 1275 1280
 AGT GCA CTA CAG CCC ATT CCA GTC TCG ACA ACA GCG CAT TTC CCC TAT 3945
 Ser Ala Leu Gln Pro Ile Pro Val Ser Thr Thr Ala His Phe Pro Tyr

1285	1290	1295	
ATG ACG CAC CCT TCA GTA CAA GCC CAC CAC CAA CAG CAG TTG			3987
Met Thr His Pro Ser Val Gln Ala His His Gln Gln Gln Leu			
1300	1305	1310	
TAAGGCTGCC CTGGAGGAAC CGAAAGGCCA AATTCCTCC TCCCTTCTAC TGCTTCTACC			4047
AACTGGAAGC ACAGAAACT AGAATTTTCAT TTATTTTGT TTTAAATAT ATATGTTGAT			4107
TTCTTGTAAC ATCCAATAGG AATGCTACA GTTCACTTGC AGTGAAGAT ACTTGGACCG			4167
AGTAGAGGCA TTTAGGAAGT TGGGGGCTAT TCCATAATTC CATATGCTGT TTCAGAGTCC			4227
CGCAGGTACC CCAGCTCTGC TTGCCGAAAC TGGAAGTTAT TTATTTTTTA ATAACCCTTG			4287
AAAGTCATGA ACACATCAGC TAGCAAAAGA AGTAACAAGA GTGATTCTTG CTGCTATTAC			4347
TGCTAAAAAA AAAAAAAAAA			4367

配列番号 : 2

配列の長さ : 203

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CACCACCAGC AACAGCAACA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG	60
CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG	120
CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG	180
CAGCATCACG GAAACTCTGG GCC	203

配列番号 : 3

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CACCACCAGC AACAGCAACA

20

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GGCCCAGAGT TTCCGTGATG

20

配列番号 : 5

配列の長さ : 165

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG 60

CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG 120

CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAG 165

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CCCTCACCAT GTCGCTGAAG C

21

配列番号 : 7

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CGACGCTAGA AGGCCGCTG

19

配列番号 : 8

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CTTGCGGACA TTGGCAGCC

19

配列番号 : 9

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TTCTCTCAGC CAAAGCCTTC TACTACC

27

配列番号 : 10

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TATCGCAGC TCCGCTCCC

19

配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGCCGGGCCG AAACGGCCG

20

請求の範囲

1. 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（ただし、第166番目ないし第188番目のGlnの繰返し数は15～100の間で変化する）をコードする核酸領域を含む核酸断片。
- 5 2. 前記核酸領域は、配列表の配列番号1に示される塩基配列のうち、49 nt～3987 ntの領域（ただし、543 nt～612 ntにあるCAG又はCAAの繰返し数は15～100の間で変化する、また、この領域中のCAAはCAGであってもよい）である請求項1記載の核酸断片。
3. 請求項1又は2記載の核酸断片によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- 10 4. 請求項3記載のタンパク質と抗原抗体反応を行う抗体。
5. 請求項1又は2記載の核酸断片から転写されるmRNAとハイブリダイズしてその翻訳を阻害する、15 bp以上のサイズを有するアンチセンス核酸。
6. 請求項1又は2記載の核酸断片を、ヒト体内で所望の遺伝子を発現させることができる発現ベクターに組込んだ、ヒト体内で前記核酸断片を発現させること
- 15 7. 請求項6記載の組換えベクターをヒトに導入し、ヒト体内で請求項1又は2記載の核酸断片を発現させる方法。

1/6

1 TATCCGCACCTCCGCTCCACCCGGCGCCTCGGCGGCGCCCGCCCTCCGATGCGCTCAGCG
1 F-1006 M R S A
61 GCCGCAGCTCCTCGGAGTCCCGCGGTGGCCACCGAGTCTCGCCGCTTCGCCGCAGCCAGG
5 A A A P R S P A V A T E S R R F A A A R
121 TGGCCCGGGTGGCGCTCGCTCCAGCGGCCGGCGGGCGGAGCGGGCGGGCGGGTGGC
25 W P G W R S L Q R P A R R S G R G G G G
181 GCGGCCCCGGGACCGTATCCCTCCGCCGCCCTCCCCCGCCCGCCCGCCCGCCCTCC
45 A A P G P Y P S A A P P P P G P G P P P
241 TCCCGGCAGAGCTCGCCTCCCTCCGCTCAGACTGTTTTGGTAGCAACGGCAACGGCGGC
65 S R Q S S P P S A S D C F G S N G N G G
301 GGCGCGTTTCGGCCCCGGCTCCCGCGCGCTCCTTGGTCTCGGCGGCCCTCCCCGCCCTTC
85 G A F R P G S R R L L G L G G P P R P F
361 GTCGTCGTCCTTCTCCCCCTCGCCAGCCCGGGCGCCCTCCGGCGCGGCCAACCCGCGCC
105 V V V L L P L A S P G A P P A A P T R A
421 TCCCGGCTCGGCGCCCGTGCCTCCCGCCCGCTTCGGCGCTCTCCTTGGCGCGCCCGGCT
125 S P L G A R A S P P R S G V S L A R P A
481 CCCGGCTGTCCCCCGCCCGGCTGCGAGCCGGTGTATGGGCCCCCTACCATGTCTGCTGAAG
145 P G C P R P A C E P V Y G F-1 P L T M S L K
541 CCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAG
165 P Q
601 CAGCAGCAGCAGCCCGCCCGCGGCTGCCAATGTCCGCAAGCCCGGGCGGACGGGCCTT
185 Q Q Q Q P P P A A A N V R K P G G S G L
661 CTAGCGTCGCCCGCCCGCGCTTCGCCGTCCTCGTCCTCGGTCTCCTCGTCTCGGCC
205 L A S P R-1 A A A P S P S S S S V S S S S A
721 ACGGCTCCCTCCTCGGTGGTTCGGCGACCTCCGGCGGGCGGAGGCCCGGCTGGGCAG
225 T A P S S V V A A T S G G G R P G L G R
781 GGTGAAACAGTAACAAAGGACTGCCTCAGTCTACGATTCTTTTGATGGAATCTATGCA
245 G R N S N K G L P Q S T I S F D G I Y A
841 AATATGAGGATGGTTCATATACTTACATCAGTTGTTGGCTCCAAATGTGAAGTACAAGT
265 N M R M V H I L T S V V G S K C E V Q V
901 AAAAATGGAGGTATATATGAAGGAGTTTTTAAACTTACAGTCCGAAGTGTGATTTGGTA
285 K N G G I Y E G V F K T Y S P K C D L V
961 CTGTGATGCCGCACATGAGAAAAGTACAGAATCCAGTTCCGGGCGCGAAACGTGAAGAAATA
305 L D A A H E K S T E S S S G P K R E E I
1021 ATGGAGAGTATTTTGTTCAAATGTTTCAGACTTTGTTGTGGTACAGTTTAAAGATATGGAC
325 M E S I L F K C S D F V V V Q F K D M D
1081 TCCAGTTATGCAAAAAGAGATGCTTTTACTGACTCTGCTATCAGTGCTAAAGTGAATGGC
345 S S Y A K R D A F T D S A I S A K V N G
1141 GAACACAAAGAGAAGGACCTGGAGCCCTGGGATGCAGGTGAACACAGCCAATGAGGAA
365 E H K E K D L E P W D A G E L T A N E E
1201 CTTGAGGCTTTGGAAAATGACGTATCTAATGGATGGGATCCCAATGATATGTTTCGATAT
385 L E A L E N D V S N G W D P N D M F R Y
1261 AATGAAGAAAATTATGGTGTAGTGTCTACGTATGATAGCAGTTTATCTTCGTATACAGTG
405 N E E N Y G V V S T Y D S S L S S Y T V

2/6

1321 CCCTTAGAAAGAGATAAAGTCAAGAAATTTTTAAACGGGAAGCAAGGGCAAACAGTTA
425 P L E R D N S E E F L K R E A R A N Q L
1381 GCAGAAGAAATTGAGTCAAGTGCCAGTACAAAGCTCGAGTGGCCCTGGAAAACGATGAT
445 A E E I E S S A Q Y K A R V A L E N D D
1441 AGGAGTGAGGAAGAAAAATACACAGCAGTTCAGAGAAATTCCAGTGAACGTGAGGGGCAC
465 R S E E E K Y T A V Q R N S S E R E G H
1501 AGCATAAACACTAGGGAAAATAAATATATTCCTCCTGGACAAAGAAATAGAGAAGTCATA
485 S I N T R E N K Y I P P G Q R N R E V I
1561 TCCTGGGGAAGTGGGAGACAGAATTCACCGCGTATGGGCCAGCCTGGATCGGGCTCCATG
505 S W G S G R Q N S P R M G Q P G S G S M
1621 CCATCAAGATCCACTTCTCACACTTCAGATTTCAACCCGAATTCTGGTTTCAGACCAAAGA
525 P S R S T S H T S D F N P N S G S D Q R
1681 GTAGTTAATGGAGGTGTTCCCTGGCCATCGCCTTGCCCATCTCCTTCTCGCCACCT
545 V V N G G V P W P S P C P S P S S R P P
1741 TCTCGCTACCAGTCAGGTCCCAACTCTCTTCCACCTCGGGCAGCCACCCCTACACGGCCG
565 S R Y Q S G P N S L P P R A A T P T R P
1801 CCCTCCAGGCCCCCTCGCGGCCATCCAGACCCCCGTCTCACCCCTCTGCTCATGGTTCT
585 P S R P P S R P S R P P S H P S A H G S
1861 CCAGCTCCTGTCTCTACTATGCCTAAACGCATGTCTTCAGAAGGGCCTCCAAGGATGTCC
605 P A P V S T M P K R M S S E G P P R M S
1921 CCAAAGGCCCAGCGACATCCTCGAAATCACAGAGTTTCTGCTGGGAGGGGTTCATATCC
625 P K A Q R H P R N H R V S A G R G S I S
1981 AGTGGCCTAGAATTTGTATCCCAACCCACCCAGTGAAGCAGCTACTCCTCCAGTAGCA
645 S G L E F V S H N P P S E A A T P P V A
2041 AGGACCAGTCCCTCGGGGGGAACGTGGTTCATCAGTGGTTCAGTGGGGTTCCAAGATTATCC
665 R T S P S G G T W S S V V S G V P R L S
2101 CCTAAAGTTCATAGACCCAGGTCTCCAGACAGAACAGTATTGGAAATACCCCCAGTGGG
685 P K T H R P R S P R Q N S I G N T P S G
2161 CCAGTTCTTGCTTCTCCCAAGCTGGTATTATTCCAAGTGAAGCTGTTGCCATGCCTATT
705 P V L A S P Q A G I I P T E A V A M P I
2221 CCAGCTGCATCTCCTACGCCTGCTAGTCTGCATCGAACAGAGCTGTTACCCCTTCTAGT
725 P A A S P T P A S P A S N R A V T P S S
2281 GAGGCTAAAGATTCCAGGCTTCAAGATCAGAGGCAGAACTCTCCTGCAGGGAATAAGAA
745 E A K D S R L Q D Q R Q N S P A G N K E
2341 AATATTAAACCAATGAAACATCACCTAGCTTCTCAAAAGCTGAAAACAAAGGTATATCA
765 N I K P N E T S P S F S K A E N K G I S
2401 CCAGTTGTTTCTGAACATAGAAAACAGATTGATGATTTAAAGAAATTTAAGAAATGATTTT
785 P V V S E H R K Q I D D L K K F K N D F
2461 AGGTTACAGCCAAGTTCTACTTCTGAATCTATGGATCAACTACTAAACAAAAATAGAGAG
805 R L Q P S S T S E S M D Q L L N K N R E
2521 GGAGAAAAATCAAGAGATTTGATCAAAGACAAAATTGAACCAAGTGCTAAGGATTCTTTC
825 G E K S R D L I K D K I E P S A K D S F
2581 ATTGAAAATAGCAGCAGCAACTGTACCAGTGGCAGCAGCAAGCCGAATAGCCCCAGCATT
845 I E N S S S N C T S G S S K P N S P S I

3/6

2641 TCCCCTTCAATACTTAGTAACACGGAGCACAAAGAGGGGACCTGAGGTCACTTCCCAAGGG
865 S P S I L S N T E H K R G P E V T S Q G
2701 GTTCAGACTTCCAGCCCAGCATGTAAACAAGAGAAAGACGATAAGGAAGAGAAGAAAGAC
885 V Q T S S P A C K Q E K D D K E E K K D
2761 GCAGCTGAGCAAGTTAGGAAATCAACATTGAATCCCAATGCAAAGGAGTTCAACCCACGT
905 A A E Q V R K S T L N P N A K E F N P R
2821 TCCTTCTCTCAGCCAAAGCCTTCTACTACCCCACTTCACCTCGGCCTCAAGCACAACCT
F-13
925 S F S Q P K P S T T P T S P R P Q A Q P
2881 AGCCCATCTATGGTGGGTCATCAACAGCCAACTCCAGTTTATACTCAGCCTGTTGTTTT
945 S P S M V G H Q Q P T P V Y T Q P V C F
2941 GCACCAATATGATGTATCCAGTCCAGTGAGCCAGGCGTGCAACCTTTATACCCAATA
965 A P N M M Y P V P V S P G V Q P L Y P I
3001 CCTATGACGCCCATGCCAGTGAATCAAGCCAAGACATATAGAGCAGTACCAAAATATGCC
985 P M T P M P V N Q A K T Y R A V P N M P
3061 CAACAGCGCAAGACCAGCATCATCAGAGTGCCATGATGCACCCAGCGTCAGCAGCGGGC
1005 Q Q R Q D Q H H Q S A M M H P A S A A G
3121 CCACCGATTGCAGCCACCCACAGCTTACTCCACGCAATATGTTGCCCTACAGTCCTCAG
1025 P P I A A T P P A Y S T Q Y V A Y S P Q
3181 CAGTTCCCAAATCAGCCCCTTGTTTCAGCATGTGCCACATTATCAGTCTCAGCATCCTCAT
1045 Q F P N Q P L V Q H V P H Y Q S Q H P H
3241 GTCTATAGTCTGTAAATACAGGGTAATGCTAGAAATGATGGCACCACCAACACAGCCAG
1065 V Y S P V I Q G N A R M M A P P T H A Q
3301 CCTGGTTTAGTATCTTCTTCAGCAACTCAGTACGGGGCTCATGAGCAGACGCATGCGATG
1085 P G L V S S S A T Q Y G A H E Q T H A M
3361 TATGCATGTCCCAAATTACCATAACAAGGAGACAAGCCCTTCTTTCTACTTTGCCATT
1105 Y A C P K L P Y N K E T S P S F Y F A I
3421 TCCACGGGCTCCCTTGCTCAGCAGTATGCCACCCCTAACGCTACCCTGCACCCACATACT
1125 S T G S L A Q Q Y A H P N A T L H P H T
3481 CCACACCTCAGCCTTCAGCTACCCCCACTGGACAGCAGCAAAGCCAACATGGTGGAAGT
1145 P H P Q P S A T P T G Q Q Q S Q H G G S
3541 CATCCTGCACCCAGTCTGTTCAGCACCATCAGCACCAGGCCGCCAGGCTCTCCATCTG
1165 H P A P S P V Q H H Q H Q A A Q A L H L
3601 GCCAGTCCACAGCAGCAGTCAGCCATTTACCACGCGGGGCTTGCGCCAACCTCCACCTCC
1185 A S P Q Q Q S A I Y H A G L A P T P P S
3661 ATGACACCTGCCTCCAACACGCAGTCGCCACAGAATAGTTTCCAGCAGCACAACAGACT
1205 M T P A S N T Q S P Q N S F P A A Q Q T
3721 GTCTTTACGATCCATCCTTCTCAGTTTCAGCCGGCGTATACCAACCCACCCCATGGCC
1225 V F T I H P S H V Q P A Y T N P P H M A
3781 CACGTACCTCAGGCTCATGTACAGTCAGGAATGGTTCTTCTCATCCAACCTGCCATGCG
1245 H V P Q A H V Q S G M V P S H P T A H A
3841 CCAATGATGCTAATGACGACACAGCCACCCGGCGGTCCCCAGGCCGCCCTCGCTCAAAGT
1265 P M M L M T T Q P P G G B Q A A L A Q S
3901 GCACTACAGCCCATTCCAGTCTCGACAACAGCGCATTTCCCCTATATGACGCACCTTCA
1285 A L Q P I P V S T T A H F P Y M T H P S
3961 GTACAAGCCCAACCAACAGCAGTTGTAAGGCTGCCCTGGAGGAACCGAAAGGCCAAAT
1305 V Q A H H Q Q Q L *

4/6

4021 TCCCTCCTCCCTTCTACTGCTTCTACCAACTGGAAGCACAGAAAAGTAGAATTTTCATTTA
4081 TTTTGTTTTTTAAAATATATATGTTGATTCTTGTAACATCCAATAGGAATGCTAACAGTT
4141 CACTTGCAGTGGAAGATACTTGGACCGAGTAGAGGCATTTAGGAAGCTGGGGGCTATTCC
4201 ATAATTCCATATGCTGTTTCAGAGTCCCGCAGGTACCCAGCTCTGCTTGCCGAAACTGG
4261 AAGTTATTTATTTTTTAATAACCCCTGAAAGTCATGAACACATCAGCTAGCAAAAGAAGT
4321 AACAAAGAGTGATTCTTGCTGCTATTACTGCT (A)_n

図 4

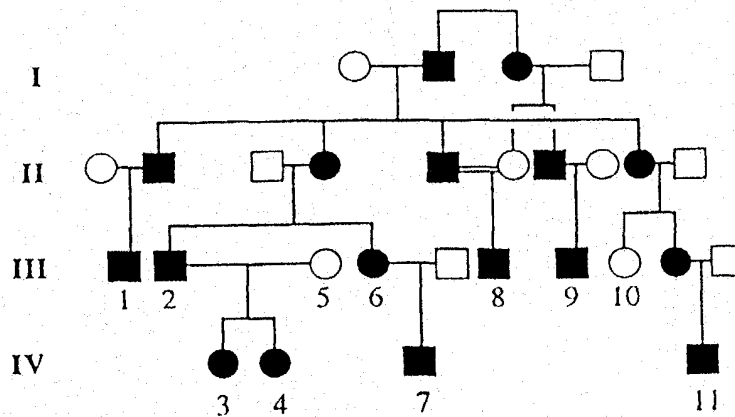
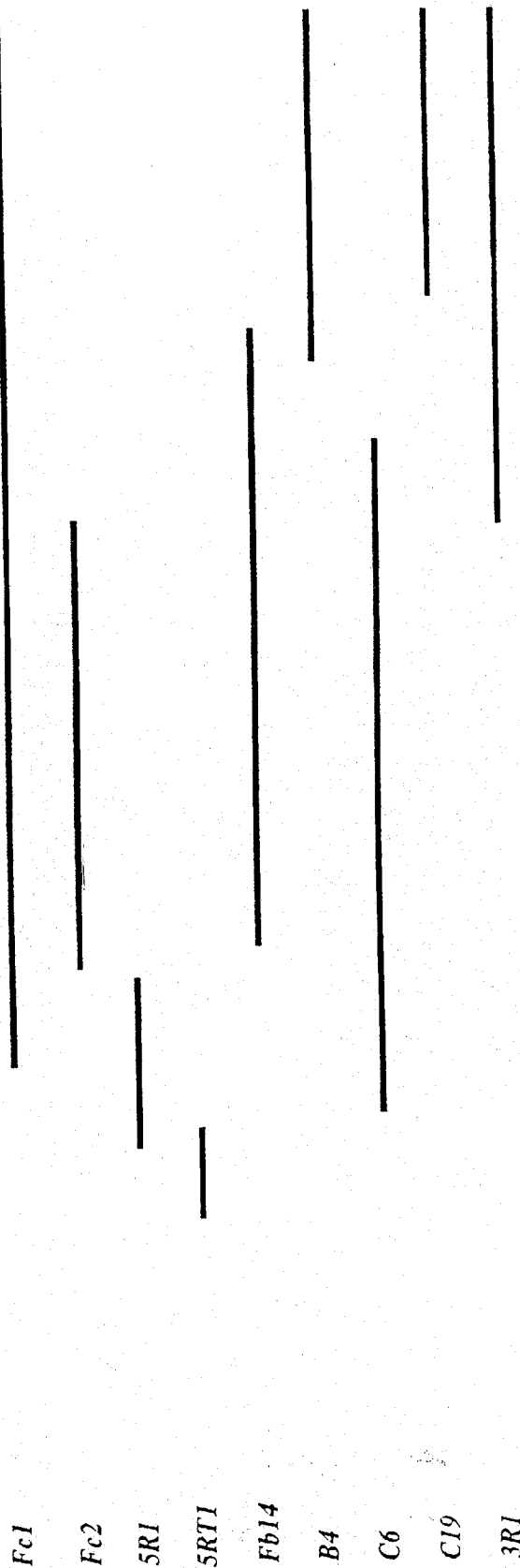
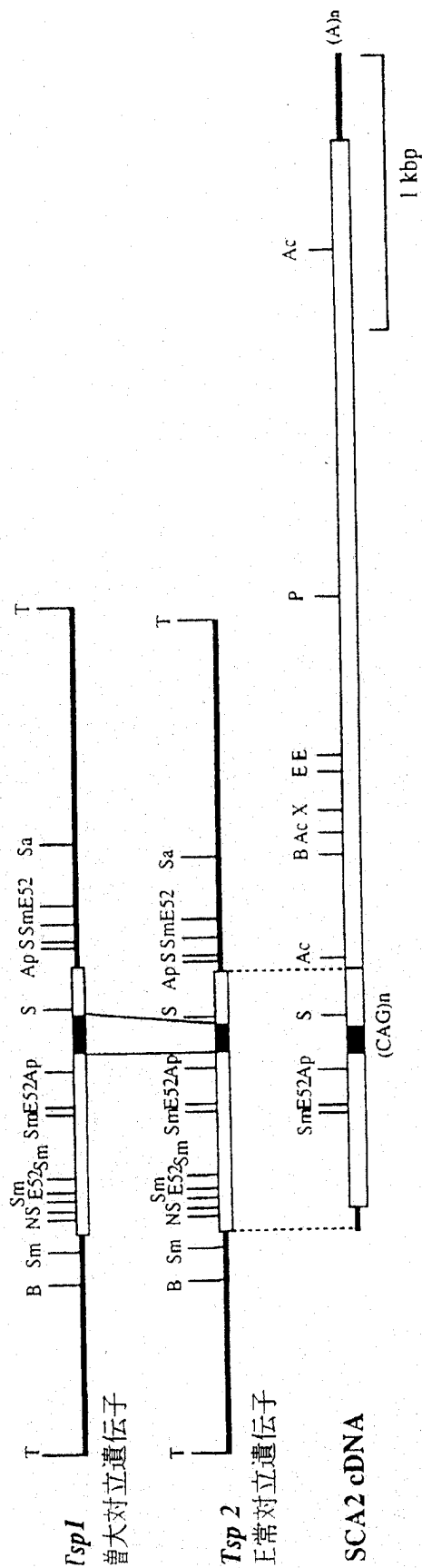


図 5

5/6



6/6

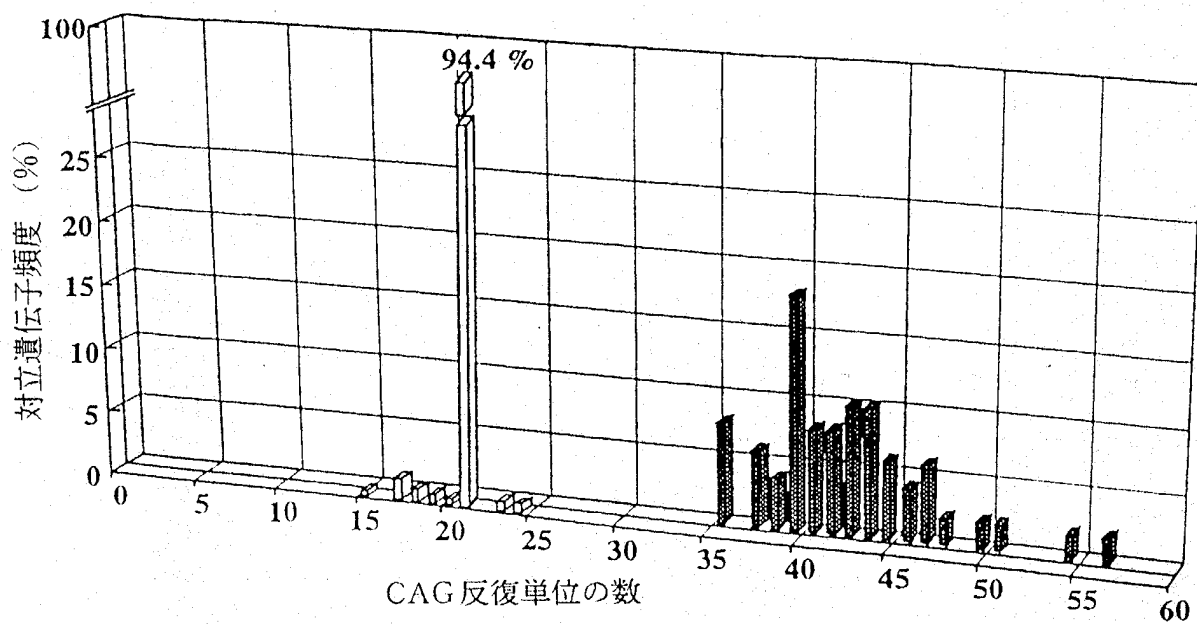


図7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/03946

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び 一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 277-284	1-7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 269-276	1-7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 285-2	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.01.98

国際調査報告の発送日

27.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男

印

4 B

9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	91	
A	Yvon, T. et al. "Polygutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four domnant cerebellar ataxias" Nature (1995) 第378巻 p. 403-406	1-7
A	Koide, R. et al. "Unstable expantion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994) 第6巻 p. 9-13	1-7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993) 第16巻 第3号 p. 572-579	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 277-284	1 - 7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 269-276	1 - 7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.), Vol. 14, No. 3, p. 285-291	1 - 7
A	Yvon, T. et al. "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995), Vol. 378, p. 403-406	1 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 16, 1998 (16. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

January 27, 1998 (27. 01. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03946

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994), Vol. 6, p. 9-13	1 - 7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993), Vol. 16, No. 3, p. 572-579	1 - 7

E P



P C T

特 許 協 力 条 件

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 97PF164 の書類記号 - PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/J P 97/03946	国際出願日 (日.月.年) 30.10.97	優先日 (日.月.年) 30.10.96	
出願人(氏名又は名称) 株式会社エスアールエル			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☒ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank (GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Sanpai, K. et al. "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 277-284	1-7
PX	Plust, S-M. et al. "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 269-276	1-7
PA	Imbert, G. et al. "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats" Nat. Genet. (1996, Nov.) 第14巻 第3号 p. 285-2	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 01. 98

国際調査報告の発送日

27.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男



4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	91	
A	Yvon, T. et al. "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias" Nature (1995) 第378巻 p. 403-406	1-7
A	Koide, R. et al. "Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)" Nat. Genet. (1994) 第6巻 p. 9-13	1-7
A	Li, S-H. et al. "Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms" Genomics (1993) 第16巻 第3号 p. 572-579	1-7